

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-309733

(43)Date of publication of application : 06.11.2001

(51)Int.Cl.

A01K 67/027
C12N 5/10
C12N 15/09
//(C12N 5/10
C12R 1:91)

(21)Application number : 2000-131255

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 28.04.2000

(72)Inventor : TAKAI YOSHIMI
MIYOSHI ATSUSHI
TANAKA MIKI
ISHIZAKI HIROYOSHI

(54) ANIMAL DEFICIENT IN Rab3 GEP ENCODED GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an animal individual hereditarily deficient in protein Rab3 GEP being a control factor of Rab3A playing an important role in releasing a neurotransmitter in a synapse.

SOLUTION: This nonhuman animal individual contains a genome gene encoding GDP/GTP exchange reaction control factor Rab3 GEP to a low-molecular weight GTP bond protein Rab3A, generating a totipotent cell substituted with a function deletion type mutant gene of the genome gene. This animal deficient in Rab3 GEP encoded gene being the offspring animal of the individual.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.11.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-309733

(P2001-309733A)

(43) 公開日 平成13年11月6日 (2001.11.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	4 B 0 6 5
15/09	Z N A	C 1 2 N 5/00	B
// (C 1 2 N 5/10		15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-131255 (P2000-131255)

(22) 出願日 平成12年4月28日 (2000.4.28)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年11月22日
第22回日本分子生物学会年会組織委員会発行の「第22回
日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 高井 義美

兵庫県神戸市西区学園東町2丁目5番地の
73

(72) 発明者 三好 淳

大阪府吹田市江坂町4-20-7-306

(72) 発明者 田中 三紀

大阪府大阪市中央区玉造1丁目6番22号
11番アイン8710の507号

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R a b 3 G E P 遺伝子欠損動物

(57) 【要約】

【課題】 シナプスでの神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしているRab3Aの制御因子であるタンパク質Rab3 GEPを遺伝的に欠損した動物個体を提供する。

【解決手段】 低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aに対するGD P/GTP交換反応制御因子Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子とその機能欠失型変異遺伝子に置換されている分化全能性細胞を発生させた非ヒト動物個体およびその子孫動物であるRab3 GEP遺伝子欠損動物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aに対するGDP/GTP交換反応制御因子Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子とその機能欠失型変異遺伝子に置換されている分化全能性細胞を発生させた非ヒト動物個体およびその子孫動物であるRab3 GEP遺伝子欠損動物。

【請求項2】 非ヒト動物が、マウスである請求項1のRab3 GEP遺伝子欠損動物。

【請求項3】 請求項1または2の動物由来の組織または細胞。

【請求項4】 低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aに対するGDP/GTP交換反応制御因子Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子とその機能欠失型変異遺伝子に置換されているE S細胞。

【請求項5】 マウス由来である請求項4のE S細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、Rab3 GEP遺伝子欠損動物に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、低分子量GTP結合蛋白質（G蛋白質）Rabファミリーに属し、シナプスにおける神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしているタンパク質Rab3Aの制御因子であるRab3 GEP遺伝子とその機能欠失型変異遺伝子に置換された遺伝子ノックアウト動物であって、体内においてRab3 GEPを合成する能力を持たない、または合成能が低い遺伝子欠損動物と、この動物の作成に不可欠なE S細胞に関するものである。この遺伝子欠損動物は、神経疾患等に対する医薬品開発等の分野において有用である。

【0002】

【従来の技術】低分子量G蛋白質のうち、細胞内小胞輸送を制御しているのがRabファミリーと呼ばれるタンパク質群であり、現在30種類以上のRabタンパク質が見出されている。特にシナプスにおける神経伝達物質の放出に関与しているのがRab3Aである（文献1, 2）。Rab3Aは不活性型のGDP結合型から活性型のGTP結合型に変わることによってCa²⁺依存性のexocytosisをコントロールしている。Rab3Aは、少なくとも3つのタンパク質、すなわちRab GDI、Rab3 GEP、Rab3 GAPによって制御されている（文献3）。GDP結合型のRab3Aは、細胞質中でRab GDIと結合して複合体を作ることによって安定し、GDIの解離したRab3AはGDP型からGTP型に変換され、シナプス小胞に結合し、Rab3Aの標的蛋白質と言われているcytosolのRabphilinやplasma membraneのRimに結合し、シナプス小胞をアクティブゾーンに誘導し、細胞膜へのdocking、fusionの過程を経て、神経伝達物質を放出する。

【0003】Rab3 GEPは、このRab3Aに対してGEP活性を持つ分子としてラットの脳からクローニングされた（文献4, 5）。Rab3 GEPは、翻訳後修飾を受けたRab3A、CおよびDに対してGEP活性を持ち、GDP結合型からGTP

結合型への変換を促進するが、GDP結合型のRab3Aに直接作用はできない。この他にRab3AにGEP活性を持つ分子として、これまでにMss4やRab3AGRFがみついているが（文献6, 7）、Mss4はRab3だけでなく、Rab1、-8、-10およびScc4にもGEP活性を示し、さらに脂質修飾の有無に関わらず活性化する（文献8, 9）。Rab3A GRFはまだ単離同定されていない。Rab3 GEPのホモログとしてCaenorhabditis elegansのaex-3とhuman MADDがある。aex-3はdefecation（排泄行動）異常の遺伝子として単離され、Rab3にGEP活性を持つ。aex-3の変異体はlocomotion、pumping、male mating、defecationに異常が認められている。またアセチルコリンエステラーゼの抑制剤であるal dicarbに耐性となる。aex-3の異常からタンパク質AEX-3はシナプス小胞放出に作用する、新たなシナプス前膜の活性調節タンパク質あることが判明している（文献10）。ただし、ヒトのMADD（MAP kinase-activating death domain protein）の性質はまだよく分かっていない（文献11）。

【0004】これまでに、Rab3A欠損マウスが作成され、解析が行われている。Rab3A欠損マウスは生存可能で、正常に発育し、形態学的にも異常は認められなかったが、テタヌス刺激に至らない14Hzの刺激に対して小胞の枯渇が見られた（文献12）。さらに、放出可能な小胞の数には変化はないが、一度にfusionする小胞の数に約2倍の増加が認められた（文献13）。また、シナプス前膜に依存する海馬ニューロンCA3のLTP（長期増強）が消失していた（文献14）。これらの報告により、Rab3Aは神経伝達物質の放出に直接的に関与していると考えられている。また、最近、この出願の発明者らは、Rabphilin-3およびRab GDI α 欠損マウスを作成し、その解析を行っている。Rabphilin-3欠損マウスは正常に発育し、神経伝達にも特に異常は認められない。Rab GDI α 欠損マウスは、脳の海馬CA1における電気生理学的実験で14Hzの繰り返し刺激に対するシナプス小胞の枯渇が認められず、短い間隔でのPPFに応答が大きくなっていった。以上より、Rab GDI α はシナプス小胞の補充速度を制御していると思われる。また、Rab GDI α は男児の遺伝性精神薄弱の原因遺伝子でもあることから（文献15）、Rab GDI α 欠損マウスはそのモデルマウスとしてメカニズムを解明できる可能性を持っている。また、Rabに対する制御因子の研究が神経伝達物質放出機構の解明の新たな手段でもある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】記憶や学習のメカニズム、あるいは各種の神経疾患の原因を解明するためには、ニューロンのシナプス機能を分子レベルで解析する必要がある。そして、そのような分子機構を理解するためには、関係する遺伝子の欠損の結果を個体レベルで解析することが不可欠である。Rab3 GEPについては、これまでにin vitroでの解析が行われてきたが（文献16）、

生体内における役割については不明である。

【0006】この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、Rab3Aに対する制御因子Rab3 GEPを遺伝的に欠損した動物個体を提供することを課題としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】この出願は、前記の課題を解決するための発明として、以下の(1)～(5)の発明を提供する。

(1) 低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aに対するGDP/GTP交換反応制御因子Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子がその機能欠失型変異遺伝子に置換されている分化全能性細胞を発生させた非ヒト動物個体およびその子孫動物であるRab3 GEP遺伝子欠損動物。

(2) 非ヒト動物が、マウスである前記発明(2)のRab3 GEP遺伝子欠損動物。

(3) 前記発明(1)または(2)の動物由来の組織または細胞。

(4) 低分子量GTP結合蛋白質Rab3Aに対するGDP/GTP交換反応制御因子Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子がその機能欠失型変異遺伝子に置換されているES細胞。

(5) マウス由来である前記発明(4)のES細胞。

【0008】以下、上記の各発明について実施の形態を詳しく説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】この出願によって提供される前記発明(1)のRab3 GEP遺伝子欠損動物は、シナプスでの神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしているRab3Aの制御因子であるタンパク質Rab3 GEPをコードするゲノム遺伝子がその機能欠失型変異遺伝子に置換されている分化全能性細胞発生させた遺伝子ノックアウト非ヒト動物である。さらに詳しくは、この発明(1)のRab3 GEP遺伝子欠損動物は、体細胞染色体のRab3 GEP遺伝子がその変異配列に置換されているヘテロ接合体、あるいはホモ接合体として提供される。

【0010】この発明(1)のRab3 GEP遺伝子欠損動物は、公知の標的遺伝子組換え法（ジーンターゲティング法：Science 244:1288-1292, 1989）により作製することができる。この標的遺伝子組換え法では、分化全能性細胞としてES（embryonic stem）細胞等を使用する。ES細胞は、マウス（Nature 292:154-156, 1981）、ラット（Dev. Biol. 163(1):288-292, 1994）、サル（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(17):7844-7848, 1995）、ウサギ（Mol. Reprod. Dev. 45(4):439-443, 1996）で確立している。また、ブタについてはEG（embryonic germ）細胞が確立している（Biol. Reprod 57(5):1089-1095, 1997）。従ってこの発明(1)のRab3GEP遺伝子欠損動物は、これらの動物種を対象に作製することができるが、特に遺伝子ノックアウト動物の作製に関して技術が整っているマウスが最適である。作製の具体的手

続を、前記発明(2)のマウスを例にとって説明すれば以下のとおりである。

【0011】まず、Rab3 GEP遺伝子のゲノムDNA断片を単離し、そのDNA断片を試験管内にて遺伝子操作し、Rab3 GEP遺伝子の開始コドンを含むDNA断片に対して改変を施すなどの、Rab3 GEP遺伝子の機能を欠失させるような変異DNA断片を作製する。Rab3 GEPゲノムDNAの単離は、例えば、公知のラットRab3 GEPのcDNA配列（文献4）等に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドプローブを用いてマウスゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。また、このRab3 GEP cDNAの一部または両端に相当する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR法によっても目的とするゲノムDNAを得ることができる。なお、マウス以外の動物を対象とする場合にも、前記のcDNA配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプローブまたはプライマーとする前記の方法により、各動物のRab3 GEP遺伝子を単離することができる。

【0012】上記のとおりの方法によって得られたマウスRab3 GEP遺伝子のゲノムDNAの一部を改変し、全能性細胞（ES細胞）のRab3 GEP遺伝子に変異を導入するためのターゲティングベクターを、公知の方法（例えば、Science 244:1288-1292, 1989）に準じて作製する。例えば、Rab3 GEP遺伝子のゲノムDNAの一部をG418等の細胞毒に対する耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子）に置換することにより、もしくは細胞毒に対する耐性遺伝子をRab3 GEP遺伝子のゲノムDNAの一部に挿入することで、Rab3 GEPのゲノムDNAと相同な配列を両端に有する変異遺伝子を保有する組換えプラスミドDNA、すなわちターゲティングベクターを作製する。なお、細胞毒に対する耐性遺伝子には、その発現を制御するためのPGK1プロモーター等の配列およびPGK1ポリアデニレーションシグナル等を連結することもできる。また、細胞毒に対する耐性遺伝子により置換、または挿入されるRab3 GEP遺伝子のゲノムDNA部位は、開始コドンを含んだエクソン領域を含むゲノムDNA領域であることが好ましい。

【0013】上記Rab3 GEP遺伝子のゲノムDNAの一部に変異を導入するためのターゲティングベクターには、Rab3 GEP遺伝子のゲノムDNAに相同な配列を有すること以外には特に制限はなく、他の薬剤耐性遺伝子や、細胞選択用遺伝子（例えば、ジフテリア毒素A遺伝子やヘルペスウイルスのサイミジンキナーゼ遺伝子）、プロモーター、エンハンサー等の配列を適宜に組み合わせて使用することができる。

【0014】次に、このターゲティングベクターを、公知の方法に準じてマウスES細胞に導入する。このような遺伝子導入法としては、公知の電気パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等も利用できるが、導入遺伝子の相同遺伝子組換え効率を勘案した場合、ES細胞

への電気パルス法が好ましい。

【0015】遺伝子導入された各ES細胞のDNAを抽出し、サザンブロット分析やPCRアッセイ等により、染色体上に存在する野生型Rab3 GEP遺伝子と導入したRab3 GEP変異遺伝子断片の間で正しく相同遺伝子組換えが起こり、染色体上のRab3 GEP遺伝子に変異が移った細胞を選択する。

【0016】こうして得た変異遺伝子を持つES細胞を野生型マウスのプラストシストに注入し、つづいてこのキメラ胚を仮親の子宮に移植する。出生した動物を里親につけて飼育させた後、Rab3 GEP変異遺伝子が生殖系細胞に入ったキメラ動物を選別する。選別は毛色の違い、または体の一部（例えば尾部先端）からDNAを抽出し、サザンブロット分析やPCRアッセイ等により行う。Rab3 GEP変異遺伝子が生殖系細胞に入ったキメラ動物と野生型動物の交配により得られる子孫について、さらに体の一部（例えば尾部先端）からの抽出DNAを材料とした、サザンブロット分析やPCRアッセイ等を行い、Rab3 GEP変異遺伝子が導入されたヘテロ接合体を同定する。作出されたRab3 GEP変異遺伝子を保有するヘテロ接合体は生殖細胞および体細胞のすべてに安定的にRab3 GEP遺伝子変異を保有しており、交配等により、効率よくその変異を子孫動物に伝達することができる。

【0017】なお、この発明(1)のRab3 GEP遺伝子欠損動物には、胎児および出生後の個体が含まれる。特に、ホモ接合体(—/—)は出生直後にチアノーゼを示して死亡するが、胎児を用いることによってRab3 GEPの完全な欠損の影響を調べることができる。また、このような胎児、あるいはその組織や細胞は神経疾患の治療薬等のスクリーニング系として利用できる。

【0018】以下、実施例を示してこの発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0019】

【実施例】1. 材料と方法

1. 1 DNAライブラリーのスクリーニング

Rab3 GEPのcDNAを、マウスの脳cDNAライブラリーλTriplex(Clontech)から単離し、シーケンスを行った。Rab3 GEP遺伝子のN末端側の領域をコードするcDNA断片をクローン化し、それをプローブとして用い、129SVJマウスのゲノムライブラリーλFIXII(Stratagene)をスクリーニングし、Rab3 GEPゲノム遺伝子を単離した。

1. 2 Rab3 GEP欠損マウスの産出

ターゲッティングベクターはRab3GEP 遺伝子のエクソン1の途中からエクソン2の途中までをneo耐性遺伝子に置き換えるよう構築し、ジフテリア毒素(DT-A)をnegative selectionに使用した。ES細胞RW4にエレクトロポレーションし、Geneticineを用いて薬剤選択を行った。薬剤耐性コロニーを5'側と3'側のプローブを用いて、サザン解析を行い、相同組換えを起こしたクローン

を決定した。相同組換えを起こしたES細胞はマウスC57BL/6Jの胚盤胞に注入し、偽妊娠マウスの子宮に移植を行い、キメラマウスを作成した。キメラマウスはBDF1マウスと交配し、ヘテロマウスを得、さらにヘテロ同士の交配によりRab3 GEP欠損マウスを得た。遺伝子型の決定は、neo遺伝子のプライマー(配列番号1および2)と、置換したRab3 GEP遺伝子のプライマー(配列番号3および4)を用いてPCR増幅を行った。PCR増幅は、DNA反応液を94℃、30秒で変性、55℃、1分でプライマーの結合、72℃、2分でDNAの合成を行い、この反応を30回繰り返した。PCR産物は、4%3:1 NuSieve agarose(Takara)/TAEゲルで電気泳動した。

1. 3 ウェスタンブロット解析

Rab3 GEP遺伝子のN末端側の365-447番目のアミノ酸残基に対する抗体を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。18.5日のマウスの脳から抽出したタンパク質をSDS-PAGEにかけ、Immobilon membrane(Millipore)に転写し、5%のスkimミルクでブロッキング、1次抗体反応を1時間、西洋ワサビペルオキシダーゼでラベルした2次抗体の反応を1時間、ECL(Amersham Pharmacia Biotech)法で検出した。

1. 4 筋電図

帝王切開によって子宮より取り出した18.5日の胎児を用いて、その横隔神経、頸髄、および坐骨神経を電気刺激し、横隔筋、大腿筋、および腓腹筋で筋電図を記録した。脊髄は18.5日の胎児から取り出し、酸素飽和した温血動物用リンゲル液中でインキュベートし、電極上に置き、電気刺激による神経伝導を記録した。

1. 5 電子顕微鏡

18.5日の胎児の横隔膜を2.5%グルタルアルデヒドで固定し、1%酸化オスミウムで後固定した。脱水処理後、Epon812樹脂で包埋し、超薄切片を電子顕微鏡で観察した。

1. 5 免疫組織学的検査

13.5日の胎児は4%パラホルムアルデヒドで1晩固定した。リン酸緩衝液で洗浄した後メタノール中に-20℃で1晩静置、50%DMSOのメタノール中に氷上で置いた。10% tritonX-100を加え、30分震盪後洗浄し、1%過ヨウ素酸水溶液中に室温で10分処理した。再び洗浄後、5% skimミルクで3時間ブロッキングし、2倍希釈した2H3ハイブリドーマ(Developmental Studies Hybridoma Bank)培養上清で1晩、室温で震盪した。洗浄後、2次抗体で1晩反応させ、洗浄し、DAB中に移し、冷却後30%過酸化水素水を加え呈色反応を行った。反応停止後、アルコール中に保存し観察した。

2. 結果

2. 1 Rab3 GEP -/-マウスの産出

Rab3 GEPのゲノムDNAのexon1の途中からexon2をneo耐性遺伝子に置き換えるようなターゲッティングベクターを作成し、ES細胞RW4にエレクトロポレーションにより導

入し、120個のG418耐性コロニーのうち6個の相同組換えを起こしたES細胞を得た。DNAはサザン解析により、制限酵素PstIで消化したときに8.9kbから5.6kbに、BamHIで消化したときには17kb以上から9.1kbにバンドがシフトするよう構築した。(図1)

そのES細胞をマウスの胚盤胞へ注入し、キメラマウスを作成し、雄のキメラマウスを雌のBDF1と交配し、Rab3 G*

*EPのヘテロマウスを得た。ヘテロ同士を交配し、その交配より得た3週令以降のマウスの遺伝型をPCRで調べた。その結果、+/+:+/-:-/-の割合が50:78:0となり、-/-マウスが存在しなかった(表1)。

【0020】

【表1】

Age	Number of Pups	Genotype		
		+/+	+/-	-/-
E13.5	14	4	7	3
E15.5	10	2	6	2
E16.5	12	1	7	4
E18.5	32	7	16	9
P0	12	6	6	0
3 weeks	128	50	78	0

【0021】そこで受精後、目を追って胎児の遺伝子型を調べてみると、胎生期には-/-マウスは確認できたが、生まれた直後、全て死亡していることが判明した。+/+マウスは+/+マウスと全く変わらず、生殖能力も正常であった。-/-マウスは胎生期は正常に发育し、体の大きさ、器官形成に異常は認められなかった(図2)。

【0022】出生直後は生存しているが自発呼吸ができず全例死亡し、四肢の動きが鈍く、また痛覚刺激に対する応答もほとんど認められなかった。

【0023】肺の組織切片を作成し、HE染色を行った。+/+マウスは肺胞が拡がっているが、-/-マウスでは自発呼吸に至らない為肺胞の拡張は確認できなかった。その他の組織に異常は認められなかった(図2)。肺の表面活性物質の有無は調べていない。

【0024】18.5日のマウスの脳のウェスタンブロットを行うと、-/-マウスでのRab3 GEPは全く発現していないことが確認できた(図1)。Rab3Aは-/-マウスで約2.5倍の増加が見られ、10万Gの超遠心で膜画分と可溶化画分に分けたサンプルでは共に増加しており、可溶化画分で+/+マウスに比べ約5.6倍だった(データ示さず)。Rab3Cでは特に変化は認められなかった。

【0025】Rab3Aの標的タンパク質として知られているRabphilin-3は反対に減少しており、+/+マウスと比較して0.36倍となっていた。Rab3 GEPの欠損でRab3AやRabphilin-3に影響がみられることにより、Rab3 GEPは生体内でもRab3に対して作用を示すタンパク質であることがわかった。

2. 2 電気生理学的結果

Rab3 GEP-/-マウスの痛み刺激に対する応答が鈍いことから、神経機能を確認するため、18.5日の胎児の筋電図の記録を試みた。結果は図3に示したとおりである。

頸髄を刺激し、大腿筋で筋電図をとると、+/+マウス

では30msにスパイクが見られるのに対し、-/-マウスではスパイクが不明瞭で、最大刺激である97Vに反応がある個体もみられた。このことにより、脊髄から運動神経を経て筋肉までのどこかに伝達障害があるものと思われる。次に運動神経から筋シナプスを経て筋の伝達を見るため、坐骨神経を刺激し腓腹筋の筋電図をとった。+/+マウスでは10~20msにスパイクが見られるのに対し、-/-マウスでは摘出サンプルも胎児全体のサンプルも全くスパイクが認められなかった。以上のことより、-/-マウスにおいて末梢神経の伝達に障害をきたしていることが示唆された。そこで呼吸に直接影響を及ぼす横隔膜を調べることにした。横隔膜神経を刺激して横隔膜の筋電図をとったところ、やはり+/+マウスは15~20msにスパイクが見られるが、+/+マウスは全く応答がなかった。また、横隔膜神経の伝導を確認したところ、+/+、-/-共に、20~30msにスパイクが認められ、神経伝導には異常はなかった。同様に脊髄を摘出し、その活動電位をとり、脊髄伝導を確認したところ、+/+と-/-に差は認められなかった。

【0026】以上より、Rab3 GEPは末梢神経シナプスにおいて、必須のタンパク質であることが確認された。

2. 3 電子顕微鏡による観察結果

さらに詳しくRab3 GEP-/-マウスの表現型を解析するため、横隔膜の神経筋接合部の電子顕微鏡写真を撮影した。結果は図4に示したとおりである。Rab3 GEP-/-マウスはシナプス小胞の数が野生型に比べ、約10分の1に減少し、アクティブゾーンの消失も認められた。クラスリンコートの小胞は、+/+マウスと-/-マウスと同じように認められることより、エンドサイトーシス(endocytosis)には障害はないと思われる。Rab3 GEPはエキソサイトーシス(exocytosis)にのみ関係し、神経伝達に必須の役割を持っていることが確認された。

2. 4 免疫組織学的検査の結果

Rab3 GEP-/-マウスの胎児を、免疫組織学的手法を用いて、神経線維の発生異常がないかを調べた。結果は図5に示したとおりである。抗neurofibriment抗体を用いて、12.5日の胎児全体のサンプルの免疫染色を行ったところ、+/+と-/-の神経線維に大きな差は認められなかった。18.5日の胎児の横隔膜のnAChReceptor（ニコチン性アセチルコリン受容体）の分布をローダミン標識αブングアロトキシンで染色したところ、-/-マウスでも染色像が認められ分布異常も認められなかった（データ示さず）。αブングアロトキシンはAChRのアンタゴニストで染色された場所は集積したAChRの存在を示しているため、nAChRは存在することが確認された。また、電気生理学的手法によっても、アセチルコリンを作用させた-/-マウスの横隔筋に収縮が認められたことにより、

Rab3 GEP-/-マウスのシナプス後膜機能は正常と思われた。以上より、Rab3 GEPの欠損による神経機能障害はシナプス後膜ではなく、シナプス前膜のみの異常であることが確認された。

【0027】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、シナプスでの神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしているRab3Aの制御因子であるタンパク質Rab3GEPを遺伝的に欠損した動物個体が提供される。

10 記憶や学習に関係する分子メカニズムの解明、あるいは各種の神経疾患の診断やその治療法、治療薬等の開発に有用である。

【0028】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Rab3 GEP遺伝子欠損動物

<130> NP00015-YS

<160> 4

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<233> Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

GGGCGCCCGG TTCTTTTGT C

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<233> Synthesized Oligonucleotide

<400> 2

GCCATGATGG ATACTTTCTC G

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<233> Synthesized Oligonucleotide

<400> 3

ACTCCAGAC CTTATTCCA T

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<233> Synthesized Oligonucleotide

<400> 4

CAAGATGATC AGCACCTTAG C

21

【0029】

【参考文献】References

1. Gonzalez, L. Jr. and Richard, H. Scheller. Regulation of membrane trafficking: Structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96, 755-758 (1999).
2. Mollard, G.F. et al. Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 1988-1992 (1990).
3. Takai, Y., T. Sasaki, H. Shirataki, & H. Nakanishi. Rab3A small GTP-binding protein in Ca^{2+} -dependent exocytosis. *Genes cells* 1, 615-632 (1996).
4. Wada, M. et al. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3A subfamily small G proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 3875-3878 (1997).
5. Sudhof, T.C. Function of Rab3 GDP-GTP exchange. *Neuron* 18, 519-522 (1997).
6. Burton, J. et al. A mammalian guanine-nucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein Sec4. *Nature*. 361, 464-467 (1993).
7. Burstein, E.S. & Macara, I.G. Characterization of a guanine-nucleotide-releasing factor and a GTPase-activating protein that is specific for the ras-related protein p25rab3A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 1154-1158 (1992).
8. Burton, J.L. et al. Specific interactions of Mss4 with members of RabGTPase subfamily. *EMBO J.* 13, 5547-5558 (1994).
9. Miyazaki, A. et al. Comparison of Kinetic properties between Mss4 and Rab3A GRF GDP/GTP exchange protein. *FEBS Lett.* 350, 333-336 (1994).
10. Iwasaki, K. et al. *aex-3* encodes a novel regulator of presynaptic activity in *C. elegans*. *Neuron* 18, 613-622 (1997).
11. Brown, T.L. and Philip H. Howe. MADD is highly homologous to a Rab3 guanine-nucleotide exchange protein (Rab3-GEP). *Curr Biol.* 8, R191 (1998).
12. Geppert, M. et al. The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369, 493-497 (1994).
13. Geppert, M. et al. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387, 810-814 (1997).
14. Castillo, P.E. et al. Rab3A is essential for mossy fiber long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388, 590-593 (1997).
15. D'Adamo, P. et al. Mutations in *GD11* are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nature genetics* 19, 134-139 (1998).
16. Oishi, H. et al. Localization of the Rab3 small G protein regulators in nerve terminals and involvement in Ca^{2+} -dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 273, 34580-34585 (1998).

【図面の簡単な説明】

【図1】上段はRab3 GEP遺伝子のジーンターゲット戦略である。上から、Rab3 GEP遺伝子、ターゲットベクター、変異遺伝子によって置換されたゲノムの構成である。下段左は、ES細胞DNAとマウス尾部から抽出したDNAのサザン解析の結果であり、下段右は各遺伝子型の脳から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析の結果である。

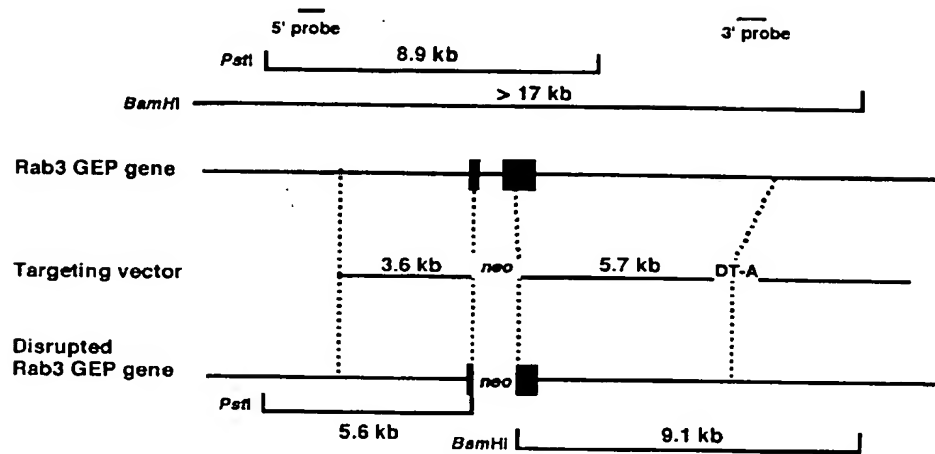
【図2】上段は、野生型とRab3 GEP-/-マウスの生後0日の外観であり、下段はそれぞれのマウスの肺の顕微鏡像である。

【図3】の様々な神経組織の筋電図である。

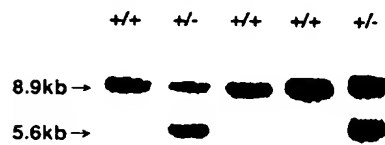
【図4】野生型とRab3 GEP-/-マウスの胎児(E18.5)の横隔膜の神経筋接合部の電子顕微鏡像である。

【図5】野生型とRab3 GEP-/-マウスの胎児(E12.5)の免疫組織学的検査の結果である。

【図1】

Targeting Construct of *Rab3 GEP* Locus

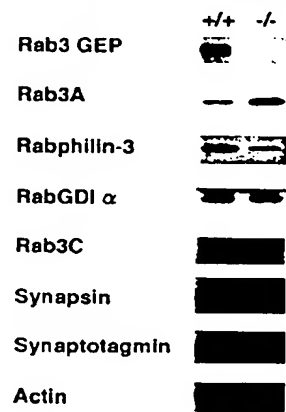
Southern Blotting of ES Cell DNA



Southern Blotting of Mouse Tail DNA



Western Blotting of E18.5 Mouse Brain Extract



【図2】

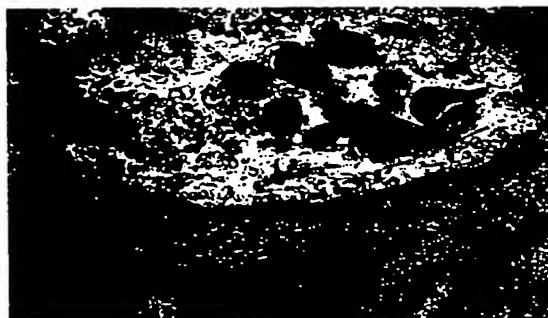
Appearance of Newborn Mice

Rab3 GEP +/+

Rab3 GEP -/-

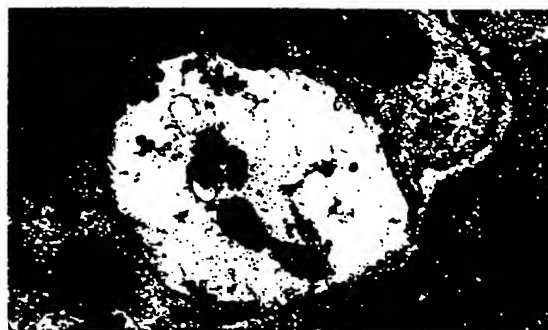


【図4】

Rab3 GEP +/+**Histopathology of the Lung**

Rab3 GEP +/+

Rab3 GEP -/-

**Rab3 GEP -/-**

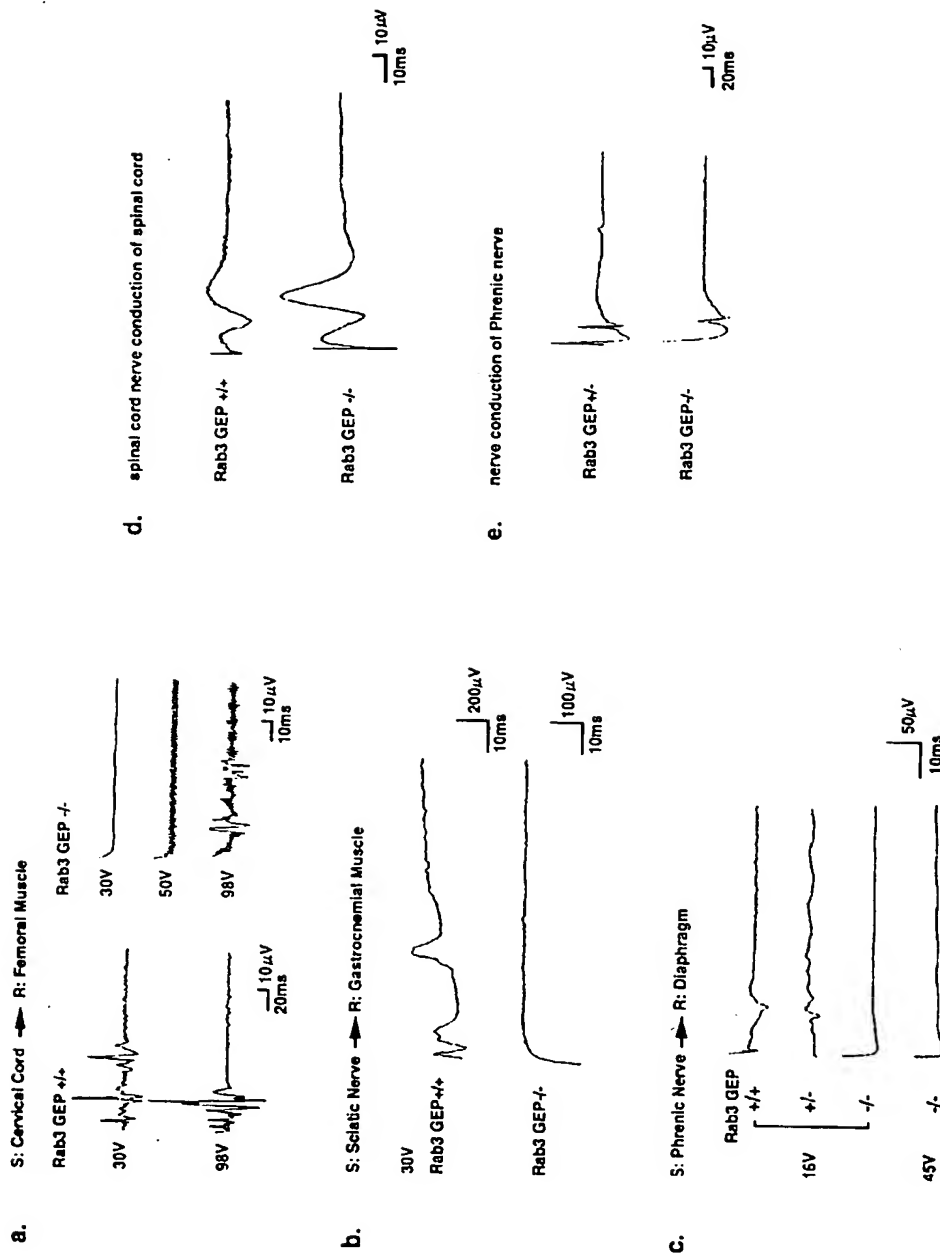
【図5】

Rab3 GEP +/+

Rab3 GEP -/-



【図3】



フロントページの続き

(72) 発明者 石崎 宏好

大阪府大阪市城東区野江 2-17-9 レグ
レス101

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA04 DA02
EA04 GA14 HA01
4B065 AA91X AA91Y AB01 BA02
BA03 CA44 CA46